

***O PAPEL DO OSTEOCLASTO
NA FISIOPATOLOGIA DE DOENÇAS DO APARELHO
LOCOMOTOR
E NA CONDIÇÃO DE ALVO TERAPÊUTICO***

Patrícia Silva ¹

Fernando Judas ²

¹Aluna da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

***²Clínica Universitária de Ortopedia do CHUC, Chefe de Serviço de Ortopedia,
Professor da FMUC***

***Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de
Ortopedia, Maio de 2013.***

***Trabalho realizado pela aluna do 5º Ano do Mestrado Integrado em Medicina da
FMUC Patrícia da Costa Gaspar Fontes da Silva***

Resumo

O osteoclasto é uma célula especializada, cuja principal função é a reabsorção óssea. Está envolvida na patogénese da osteoporose, da Doença de Paget e das metástases ósseas, entre outras. Este trabalho visa resumir aspetos fundamentais relativos ao osteoclasto na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor e, na condição de alvo terapêutico.

O osteoclasto dispõe de mecanismos de acidificação e de proteases para a reabsorção óssea. Desempenha uma função importante na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor que incluem a osteoporose, doença de Paget, osteopetrose, entre outras. Para

além disso, é alvo de fármacos que habitualmente diminuem a perda óssea, tais como, bifosfonatos, estrogénios de substituição pós-menopáusica, calcitonina e denosumab. Os bifosfonatos, apesar de largamente usados, têm efeitos secundários e algumas limitações em termos de eficácia. Os estrogénios têm a desvantagem de não poderem ser utilizados a longo termo devido aos efeitos secundários que apresentam. O denosumab interfere com o eixo do RANK/RANKL e tem-se mostrado superior aos bifosfonatos em vários contextos clínicos. A calcitonina concorre para uma boa qualidade óssea. Novos fármacos, nomeadamente inibidores de enzimas envolvidas na reabsorção ou dos mecanismos de acidificação, têm apresentado resultados preliminares promissores.

Assim, o osteoclasto oferece uma diversidade de alvos terapêuticos, com interesse em múltiplas patologias, prevendo-se avanços significativos a curto prazo, no tratamento de doenças do aparelho locomotor tais como a osteoporose, a Doença de Paget, metástases ósseas, entre outras.

Palavras-chave

Osteoclasto, reabsorção óssea, remodelação óssea, osteoporose, metástases ósseas, bifosfonatos, denosumab, calcitonina.

Sumário

1. Introdução (4)

2. O papel do osteoclasto na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor (13)

3. O osteoclasto na condição de alvo terapêutico (22)

4. Conclusões (38)

5. Bibliografia (39)

1. Introdução

O osteoclasto é uma das células mais especializadas do corpo humano, tendo como principal função a reabsorção óssea, através de um conjunto de enzimas, moléculas de adesão e mecanismos de reconhecimento, que permitem um equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo. Estima-se que cerca de 10% da massa óssea humana é remodelada a cada ano de vida, salientando-se a importância que a deposição de matriz óssea [1], mas também a sua destruição têm no tecido ósseo. O osteoclasto é, por isso, fundamental na manutenção de uma massa e estrutura óssea adequada ao longo da vida, mas ao mesmo tempo está também envolvida em vários processos patológicos do esqueleto, nomeadamente a osteoporose, a doença de Paget e as metástases ósseas, para referir as mais comuns. A osteoporose tem particular interesse, visto que é uma doença de elevada prevalência, que condiciona uma elevada morbilidade e mortalidade, assim como avultados encargos sociais e económicos, que advêm das suas complicações: fraturas, particularmente as vertebrais e as do fémur proximal [2]. Em Portugal mais de meio milhão de portugueses sofre de osteoporose, sobretudo mulheres, de acordo com a Direcção-Geral da Saúde em 2008. Já a doença de Paget, que afeta até 10% dos adultos na Europa Ocidental, podendo causar incapacidades consideráveis. Uma atuação atempada é fundamental para a prevenção da evolução da doença e a manutenção da qualidade de vida dos doentes [3].

Relativamente às metástases ósseas, estas estão associadas a diversos tumores, particularmente aos da próstata e da mama, mas também a neoplasias malignas do rim, tiróide e pulmão. As metástases estão não só associadas a um pior prognóstico dos doentes, mas também a uma pior qualidade de vida, aumentando a ocorrência de eventos associados ao tecido ósseo, como é o caso da dor óssea e das fraturas [4]. O

osteoclasto surge então como um alvo terapêutico de interesse, não só para estas patologias referidas, como para outras que serão exploradas ao longo do trabalho, multiplicando-se os estudos sobre a sua histologia e fisiologia, mas também relativos a novas terapêuticas que permitem modificar a sua atividade.

A osteoclastogénese (processo de formação e osteoclastos) é um processo complexo (Figura 1 - Esquema simplificado da osteoclastogénese e os seus principais moduladores: o eixo RANK/RANKL/OPG e o M-CSF), com início em células estaminais hematopoiéticas (apesar de os osteoclastos poderem ter origem não apenas destas células, mas também de monócitos circulantes, macrófagos peritoneais, células dendríticas e células T ativadas e algumas células neoplásicas [1]) que, devido à ligação do fator estimulante de colónias de macrófagos (M-CSF), ao recetor da superfície celular c-Fms (CSF1R), que se autofosforila e ativa a cinase regulada por sinais extracelulares 1 ou 2 (ERK1/2) e a fosfatidilinositol-3-cinase/Akt [7], sendo este o primeiro passo na formação do osteoclasto. O M-CSF será necessário ainda para a proliferação e maturação dos pré-osteoclastos. Outra proteína fundamental na osteoclastogénese é o ligando para o recetor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), uma citocina pertencente à superfamília dos Tumor Necrosis Factor (TNF) [7], que é expresso na superfície de osteoblastos, células do estroma e células do sistema imune, apesar de, por clivagem ou produzido por linfócitos T, poder existir também na forma solúvel. Ao interagir com o recetor ativador do fator nuclear κ B (RANK), que se encontra na superfície dos precursores de osteoclastos, ativa enzimas MAPKs (p38, cinase regulada por sinais extra-ceulares (ERK) e cinase N-terminal Jun) e estimula uma variedade de fatores de transcrição e, deste modo, promove a osteoclastogénese, mas também influencia a resistência de osteoclastos à apoptose e os mecanismos de reabsorção óssea. O ião cálcio tem uma função significativa no controle da

osteoclastogénese, visto que o RANK utiliza sinais dependentes, no início da osteoclastogénese, de oscilações intracelulares e, numa fase mais avançada da diferenciação, de uma concentração intracelular elevada mantida do Ca^{2+} , nas quais estão envolvidos membros da superfamília de canais iónicos TRP, e da consequente ativação do fator de transcrição NFAT que irá aumentar a transcrição de genes necessário à diferenciação osteoclástica [8, 9].

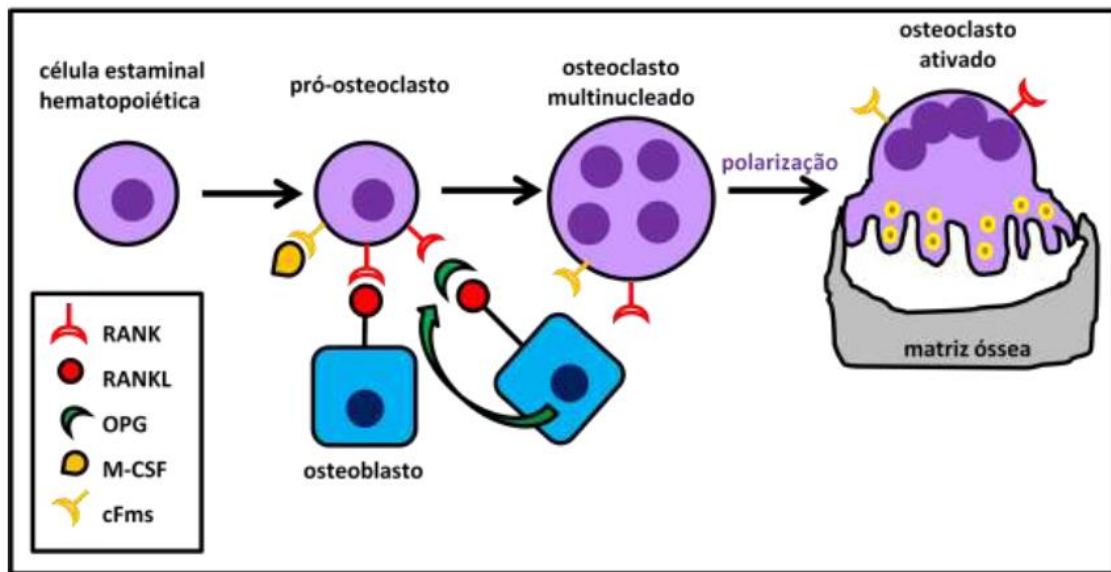


Figura 1 - Esquema simplificado da osteoclastogénese e os seus principais moduladores:

o eixo RANK/RANKL/OPG e o M-CSF. cFms = recetor do fator estimulante de colónias de macrófagos, M-CSF = fator estimulante de colónias de macrófagos, RANK = recetor ativador do fator nuclear kappa B, RANKL = ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa B, OPG = osteoprotegerina.

De salientar que, in vivo, a interação RANKL/RANK é geralmente um processo célula-a-célula, surgindo o RANKL solúvel geralmente em estados pró-inflamatórios [7]. A osteoprotegerina (OPG) é outra proteína expressa pelos osteoblastos e células do estroma, com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu recetor RANK, regulando deste modo a osteoclastogénese e a

reabsorção óssea. O eixo RANKL/RANK/OPG é sem dúvida o principal regulador da diferenciação osteoclástica, sendo este eixo afetado por muitos outros agentes. Os estimuladores da produção de RANKL incluem a vitamina D, a hormona paratiroide, o TNF- α , os glucocorticoides, a interleucina-1 e 11, hormonas da tiróide (T3 e T4), prostaglandina E2, lipossacáridos, fator de crescimento dos fibroblastos 2, histamina, fator de crescimento insulina-like, histamina e situações de força gravítica baixa. Como inibidores da produção do RANKL temos essencialmente os estrogénios e o TGF- β [5]. Os TRAFs parecem ser moléculas centrais nas cascatas sinalizadoras que regulam a osteoclastogénese, visto que a sua interação com a c-Src e outras cinases é fundamental nas cascatas para ativação de fatores de transcrição favorecedores da osteoclastogénese. [10]

Neste processo dependente do RANKL há então diferenciação dos precursores em osteoclastos, ocorrendo fusão de 10 a 20 células mononucleares. Esta célula multinucleada sofrerá nos estádios finais de diferenciação um aumento na expressão de integrinas, heterodímeros com subunidades α e β , com domínios longos extracelulares e curtos intracelulares, que permitem a adesão do osteoclasto à matriz óssea e transmitir essa informação ao interior da célula [7] , particularmente o heterodímero $\alpha_v\beta_3$ (recetor para a vitronectina), que, para além da função já descrita para as integrinas, é ainda essencial para a polarização do osteoclasto: processo em que ocorre um rearranjo dos componentes intracelulares, de modo a facilitar o transporte lisossomal para o bordo em escova onde se dá a reabsorção óssea, e o transporte em sentido inverso das substâncias reabsorvidas através da membrana basolateral. Para além da polarização, de modo a permitir uma eficaz adesão à matriz óssea, há ainda um rearranjo do citoesqueleto, de modo a formar um “anel de actina”, particularmente filamentos de β -actina [11], com numerosos podossomas, que é um marcador de osteoclasto ativo. Estes dois processos

dependem de várias cascatas de sinalização intracelular, sendo importantes tirosina-quinases como o C-Src, o Syk e a tirosina-quinase rica em prolina 2, assim como o fator de transcrição da microftalmia, que parece ser um importante regulador da transcrição dos genes osteoclásticos [11]. Da interação entre o anel de actina, as integrinas e a matriz óssea surge uma zona selada: a lacuna de reabsorção, na qual se irão libertar, a partir das vesículas intracelulares acídicas presentes no osteoclasto, iões hidrogénio (H^+) e protéases, como a: catepsina K, a metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9) e a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) [12]. Os iões H^+ são importantes para a acidificação da lacuna, sem a qual a reabsorção não será possível. Estes são gerados por enzimas como a anidrase carbónica II (CA2) e transportados para os vacúolos através da ATPase vacuolar (V-ATPase) e de canais de cloro 7 (CIC-7) [13]. A ativação do osteoclasto ocorre com a formação do bordo em escova, resultante da fusão destas vesículas acídicas com a membrana do osteoclasto, originando uma membrana com numerosas invaginações dentro da lacuna de reabsorção. Este passo ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se ser necessária a molécula sinalizadora Rab7 [11]. O osteoclasto maduro é caracterizado pela expressão de uma série de marcadores próprios, nomeadamente: fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9), catepsina K, anidrase carbónica II (CA2), a subunidade $\alpha 3$ da ATPase vacuolar (V-ATPase $\alpha 3$), canal de cloro 7 (CIC-7), proteína transmembranar associada à osteopetrose 1 (OSTM1) e recetor da calcitonina [11].

A reabsorção óssea (ver Figura 2 – Esquema simplificado da reabsorção óssea) ocorre a nível do bordo em escova na membrana apical do osteoclasto, na lacuna de reabsorção, e pode ser dividida em dois processos: a secreção ácida e a proteólise, apesar de, provavelmente, ambos estes processos ocorrerem em simultâneo. A reabsorção inicia-se com a secreção ativa de protões através de uma ATPase vacuolar e

por transporte passivo de cloro, por canais de cloro, nomeadamente o CIC-7, que permitem garantir um microambiente ácido o suficiente ($\text{pH} \approx 4,5$ [7]) para que haja a reabsorção óssea. Também a anidrase carbónica II é essencial para a manutenção deste ambiente ácido, visto que, ao catalisar a formação de protões e bicarbonato a partir de ácido carbónico, irá disponibilizar iões H^+ e, indiretamente, Cl^- , porque a nível da membrana basolateral o bicarbonato é trocado por cloro via o trocador de aniões 2. A proteólise de colagénio tipo 1 na matriz óssea é mediada, habitualmente, pela cathepsina K, uma cisteína-proteinase. Esta enzima é ativa em meios francamente ácidos, como o encontrado na lacuna de reabsorção. Também as metaloproteinases da matriz têm um papel na reabsorção óssea, variável com o tipo de tecido ósseo em questão e particularmente importante a nível do osso cortical, se bem que a sua função exata ainda não é totalmente conhecida. O material reabsorvido é removido da lacuna de reabsorção através do osteoclasto por sistemas de transporte variados. Quando termina a reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose ou iniciam um novo ciclo de reabsorção.

Apesar do ênfase na reabsorção óssea, a principal função do osteoclasto, este apresenta outras, nomeadamente: estimulação da função osteoblástica, apresentação de antígenos (funcionando de modo semelhante a outras células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, apesar de menos importantes, em que há estimulação de recetores Toll-like, com consequente aumento das moléculas necessárias à apresentação de antígenos como o MHC e com secreção de mediadores inflamatórios) e homeostase do metabolismo dos glícidos (a reabsorção óssea liberta da matriz óssea osteocalcina, um pequeno péptido que auxilia na manutenção de níveis adequados de glucose plasmática).

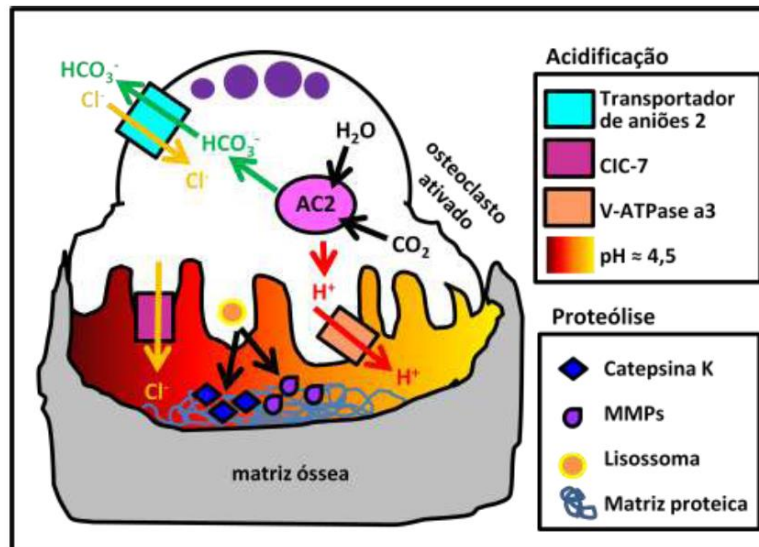


Figura 2 – Esquema simplificado da reabsorção óssea. As setas representam a direção dos íons com a mesma cor. AC2= anidrase carbônica II, CIC-7 = canal seletivo de íons cloro 7, MMPs = metaloproteinases da matriz, V-ATPase α3 = subunidade α3 da ATPase vacuolar.

O fenótipo do osteoclasto é influenciado não só pela idade e o tipo de tecido ósseo, mas também pelos fatores do microambiente, nomeadamente os estrogénios e citocinas e mesmo fármacos. Por esta razão foi possível demonstrar a existência de subtipos de osteoclastos com especificidades diferentes, como é o caso dos existentes no tecido ósseo formado por ossificação endocondral ou intramembranosa. No primeiro caso, os osteoclastos endocondrais, a acidificação de vesículas parece ser dependente do trocador de ânions e bicarbonato Ae2 e do canal de cloro CIC-7, que parecem não estar envolvidos no caso dos osteoclastos intramembranosos, o segundo caso. Neste subtipo a reabsorção mediada por metaloproteinases da matriz e pela catepsina L sobrepõe-se à catepsina K, que é a principal interveniente na reabsorção dos osteoclastos intramembranosos. Também a fosfatase ácida tartarato-resistente parece ser importante no osso cortical. Estas diferenças poderão eventualmente ser devidas a particularidades

da matriz óssea do osso esponjoso ou cortical. A nível da cartilagem encontram-se também osteoclastos, que apresentam um bordo em escova menos exuberante, os condroclastos. Parecem ter um papel importante na ossificação endocondral, tendo a capacidade de reabsorver tanto cartilagem como tecido ósseo. A importância do osteoclasto na ossificação endocondral é tal que em estudos em animais com mutações no processo de acidificação ou com osteoclastos incapazes de formar lacunas de reabsorção funcionais estes apresentem ossos constituídos maioritariamente por cartilagem.

É ainda interessante referir que existe uma variação diurna dos marcadores de reabsorção óssea no plasma circulante. Aparentemente há uma redução em cerca de 50% na reabsorção do tecido ósseo após as refeições, aparentemente mediada pelo GLP-2, mas durante a noite há um incremento na mesma proporção dos níveis basais de reabsorção óssea. Estas alterações não são acompanhadas por alterações nos números de osteoclastos, pelo que se suspeita que sejam devidas à alteração da taxa de atividade destas células.

A regulação da apoptose dos osteoclastos, apesar de ter várias especificidades (por exemplo o TNF promove a sobrevivência e não a apoptose destas células), possui mecanismos de morte semelhantes aos das outras células: uma cascata iniciada por recetores sinalizadores de morte e outra regulada pela família de proteínas Bcl-2. Ambas as cascatas apoptóticas ativam caspases intracelulares que digerem os conteúdos celulares. Existem vários estímulos anti-apoptóticos ou pró-sobrevivência nos osteoclastos, nomeadamente, o RANKL, o TNF, o M-CSF, a IL-1, a interação com integrinas (que ativam cinases Src), a PTH, a vitamina D3 [14].

O sistema imune também influencia a regulação da osteoclastogénese. O TNF- α , a IL-1 e a IL-6 estimulam diretamente a osteoclastogénese, a reabsorção óssea e a

produção de RANKL pelos osteoblastos. Foi ainda provado que a IL-20 é uma citocina osteoclastogénica, que favorece a expressão do RANK nos precursores osteoclásticos e a de RANKL nos osteoblastos, afetando a função de ambos os tipos de células [15]. Também o complemento, nomeadamente C3a e C5a, influenciam a interação osteoblasto-osteoclasto, particularmente num ambiente pró-inflamatório, como o que existe em diversas patologias, e parecem ainda ter um papel direto na osteoclastogénese, não dependente do RANKL ou do M-CSF [16]. Também os osteoclastos e osteoblastos influenciam o sistema imune. Os osteoclastos são capazes de ativar o complemento num ambiente pró-inflamatório e o RANKL estimula a produção de IL-1 e TNF- α em precursores de osteoclastos [17]. Estas considerações permitem por um lado ver o sistema imune como um alvo terapêutico nas patologias ósseas associadas a inflamação, mas é preciso também ter em conta que tratamentos que influenciam o sistema imune, utilizados noutros contextos clínicos, podem ter efeitos nefastos no metabolismo ósseo [18].

2. O papel do osteoclasto na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor

O equilíbrio da interação osteoblasto-osteoclasto é fundamental para a manutenção da integridade do esqueleto ao longo da vida. Qualquer alteração nestas células terá um impacto negativo no tecido ósseo. Modificações na atividade ou número de osteoclastos têm sido detetadas em diversas patologias, algumas caracterizadas por uma reabsorção óssea excessiva como é o caso da osteoporose e da doença de Paget; outras associadas à ativação secundária de osteoclastos, sendo exemplos as metástases osteolíticas e a artrite reumatóide; e ainda, no polo oposto, as patologias em que os osteoclastos apresentam alterações no seu processo de diferenciação ou na sua função, do qual faz parte a osteopetrose. Estas doenças têm permitido compreender a função do osteoclasto e a importância do acoplamento reabsorção/formação de tecido ósseo [11].

2.1. Osteoporose

De acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) a osteoporose é definida como uma densidade mineral óssea (DMO) igual ou inferior a dois desvios-padrão e meio relativamente à média da DMO de mulheres jovens saudáveis, isto é, um score-T $\leq 2,5$ desvios-padrão [24]. A OMS, devido à morbilidade e mortalidade associadas à osteoporose e às fraturas desta decorrentes, particularmente a fratura do colo do fémur, considera essencial a prevenção desta doença para a manutenção da saúde, qualidade de vida e independência na população idosa, daí que os seus mecanismos fisiopatológicos sejam um área de estudo bastante ativa.

Apesar de se saber que com o aumento da idade surgem perturbações na função osteoblástica, sabe-se que a reabsorção óssea é um fator determinante no surgimento da osteoporose. Esta patologia é a forma de perda óssea associada à idade, mais comum em mulheres pós-menopáusicas, estando associada neste grupo essencialmente ao decréscimo de estrogénios, que são potentes inibidores da atividade osteoclásticas, através de dois mecanismos: menor expressão global do RANKL e diminuição da resposta osteoclástica à mesma molécula. Esta interação é mediada por dois recetores de estrogénios: α e β , expressos em proporção diferente de acordo com o tipo de tecido ósseo e o estágio de maturação do osteoclasto. Os recetores de estrogénio α (ER- α) estão mais presentes nos osteoclastos corticais e imaturos, mas curiosamente parece ter uma função mais importante nos osteoclastos do tecido ósseo esponjoso. Já os recetores de estrogénio β (ER- β) estão presentes em todo o processo de diferenciação do osteoclasto e em maior quantidade nos osteoclastos trabeculares. É portanto fácil compreender que nas doentes osteoporóticas há uma osteoclastogénese e uma reabsorção óssea aceleradas, fruto do decréscimo dos níveis de estrogénios, identificadas *in vitro* em populações de osteoclastos de doentes osteoporóticas. Também as células T parecem estar envolvidas neste processo, pois respondem ao decréscimo destas hormonas com um aumento da produção do RANKL, podendo estas ser um importante mediador na fisiopatologia da osteoporose. De salientar que também a dihidrotestosterona apresentou efeitos semelhantes aos estrogénios *in vitro*, mas o mecanismo de inibição dos osteoclastos ainda não é bem conhecido, podendo estar associado à sua conversão em estrogénios, visto que a presença de mutações na enzima aromatase, que catalisa esta conversão, leva a uma diminuição de massa óssea. No entanto, em animais com mutações nos recetores de estrogénio α (ER- α), as fêmeas apresentaram perda óssea, mas os machos não, o que vai contra esta hipótese. Esta

discrepância sugere uma especificidade do sexo masculino ou feminino na ação dos estrogénios in vivo, em que os estrogénios nos tecido ósseos masculinos têm uma ação osteoprotetora devido a recetores de estrogénio (ER) nos osteoblastos contra a ação predominantemente anti-reabsortiva que ocorre no tecido ósseo feminino [25].

Estudos familiares e com gémeos encontraram vários genes associados à diminuição de massa óssea com a idade. A maioria diz respeito a alterações na formação de matriz óssea pelos osteoblastos, mas algumas relativas ao osteoclasto e aos mecanismos de reabsorção têm sido descritas, nomeadamente polimorfismos nos genes que codificam o RANK, o RANKL e a OPG e mutações nos recetores de estrogénios.

Admite-se que a perda de massa óssea associada à idade e a osteoporose sejam multifatoriais na maior parte dos casos, sendo influenciadas não só por elementos intrínsecos, como a função osteoclástica e processos inflamatórios, mas também por fatores extrínsecos, como a nutrição.

Uma nota ainda sobre a osteoporose secundária, de que a causa mais comum é a terapêutica com glucocorticoides. Este grupo farmacológico inibe a osteoblastogénese e promove a apoptose de osteoblastos e osteócitos, promove a expressão de RANKL e diminui a de OPG, ainda não tendo sido definida a sua ação nos osteoclastos. Isto resulta numa osteoporose com números baixos de osteoblastos e osteoclastos, ao contrário do que ocorre na osteoporose pós-menopáusica [26]. Estes efeitos são dependentes da dose de glucocorticoides utilizada. Este facto levou ao estudo da ação de outros imunossuppressores não-glucocorticoides, nomeadamente no contexto da transplantação renal, cujas conclusões referem que o sirolimus poderá ter um efeito que contrarie a perda óssea dos glucocorticoides [27].

2.2. Doença de Paget

A doença de Paget é uma patologia de aparecimento tardio, relativamente comum na população caucasiana, em que afeta cerca de 3% dos indivíduos e que se manifesta habitualmente por dor óssea, mas também por surdez e compressão de raízes nervosas. A doença é caracterizada por aumentos focais nas populações de osteoclastos e na sua nuclearidade e tamanho, causando a destruição óssea, apesar da ativação de osteoblastos vizinhos, apresentando zonas de remodelação óssea anormal (podendo ser classificada em monostótica ou poliestótica), o que leva à deformação e enfraquecimento ósseos e ao aumento de risco de fratura consequentemente. Algumas causas genéticas foram já descritas e incluem mutações em quatro genes que codificam o RANK, a OPG e as proteínas p97 e p62, todas proteínas envolvidas no controle da osteoclastogénese. Estas mutações tornam os osteoclastos mais sensíveis à estimulação do RANKL e têm como resultado o aparecimento de um número anormalmente elevado de osteoclastos e de osteoclastos gigantes. Interessantemente a mutação mais comum, a da p62, proteína que liga à ubiquitina e está envolvida na ativação do recetor nuclear κ B pela cascata do RANK, parece não ser suficiente para o surgimento da doença por si só, necessitando de outros fatores para que ocorra o desenvolvimento da patologia. Tem sido descrita a eventual ação de alguns vírus neste processo, se bem que é um tópico não consensual.

Uma nota sobre a doença de Paget juvenil, autossómica recessiva, rara, mais grave e de surgimento precoce, que está associada a mutações no gene que codifica a OPG.

Nestes doentes há um aumento dos marcadores bioquímicos tanto da reabsorção como da formação óssea, mas a primeira excede claramente a segunda. Não existem no entanto estudos que explicitem se os mecanismos de reabsorção do osteoclasto estão alterados ou não na doença de Paget, nem a razão pela qual as lesões são focais e não generalizadas a todo o esqueleto.

2.3. Osteopetrose

O termo osteopetrose é derivado do grego “osteo” que significa osso e “petros” que significa pedra. É um grupo heterogêneo de patologias que apresentam um aumento da densidade óssea, nomeadamente em exames radiológicos, e que pode ir desde assintomática até fatal na infância. As formas mais severas são geralmente as autossômicas recessivas, enquanto que as mais ligeiras têm hereditariedade variável, surgindo mais tardiamente [28].

A osteopetrose é caracterizada por uma reabsorção óssea anormal, resultando num tecido ósseo de dureza elevada e propício a fraturas. Para além destas, outras manifestações incluem a hematopoiese extramedular, a surdez, a cegueira e a paralisia facial (as últimas três devido a compressão das raízes dos nervos cranianos). Pode estar associada a números normais ou elevados de osteoclastos – a osteopetrose rica em osteoclastos – ou, mais raramente, diminuídos ou mesmo ausentes – a osteopetrose pobre em osteoclastos.

Na osteopetrose rica em osteoclastos as mutações mais comuns encontram-se nos genes que codificam a subunidade 3 da ATPase vacuolar, o CIC-7 ou a proteína transmembranar associada à osteopetrose 1. O défice de secreção ácida provocava nestes osteoclastos a formação de um bordo em escova alterada e uma acumulação de material em vesículas, com lacunas de reabsorção pouco profundas. Estes osteoclastos mostraram *in vitro* uma taxa de sobrevivência maior que osteoclastos normais, o que vai de encontro ao número elevado de osteoclastos presentes neste tipo de osteopetrose. Nesta patologia há um claro desacoplamento entre a reabsorção e a formação de tecido ósseo ainda não totalmente compreendido [13, 28].

Na osteopetrose pobre em osteoclastos estão geralmente implicadas alterações nos genes do RANK e RANKL, no entanto o fenótipo é geralmente menos severo que nas

formas de osteopetrose ricas em osteoclastos [11], o que corrobora a importância destas células na formação de tecido ósseo.

A picnodisostose é uma patologia rara caracterizada por baixa estatura e osteosclerose generalizada, englobada no espectro da osteopetrose. É uma doença autossômica recessiva. Os doentes apresentam frequentemente dismorfismos ósseos e radiograficamente os achados são semelhantes à osteopetrose, sendo os ossos densos e com maior tendência a fraturas. Histologicamente existe um aumento do número de osteoclastos, de morfologia normal, mas com mutações no gene da catepsina K, pelo que se acumulam no osteoclasto vesículas repletas de colagénio não digerido, que preenche também as lacunas de reabsorção. Estudos em animais sugerem que o osso esponjoso é o mais afectado por esta patologia, visto que no osso cortical as MMPs permitem uma reabsorção óssea mais próxima do normal [11, 13].

2.4. Artrite reumatóide

Para além da inflamação da sinovial, uma manifestação clínica major da artrite reumatoide é a destruição progressiva de estruturas ósseas e cartilagíneas, levando radiologicamente a erosões ósseas e à diminuição da entrelinha articular. Os processos inflamatórios na base da patogénese desta doença têm sido bastante estudados [6], existindo nos estádios mais tardios da artrite reumatoide uma destruição óssea considerável pelos osteoclastos em parte dependente de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , que não só estimulam a produção de RANKL e OPG, mas também têm uma ação direta nos osteoclastos e nos seus precursores [29]. No entanto, estes osteoclastos têm algumas características particulares: degradam cartilagem calcificada e a sua osteoclastogénese é em parte mediada pelo fator de necrose tumoral

α (TNF- α), para além do RANKL. O processo de reabsorção é também influenciado por citocinas como a interleucina 1. A catepsina K parece também estar envolvida na destruição de cartilagem, mas o seu papel ainda não foi estabelecido. Mais consensual é a importância das MMP na reabsorção de componentes cartilagíneos [13].

2.5. Metástases ósseas

Vários tipos de tumores podem metastizar para o tecido ósseo e formar metástases osteolíticas, osteoblásticas, osteoporóticas ou mistas [4]. A célula metastática, ao atingir o tecido ósseo, estabelece com este um ciclo vicioso de destruição óssea: primeiro o tumor secreta fatores como o peptídeo relacionado com a PTH (PTHrP), que estimulam as células ósseas que libertam fatores de crescimento, como o TGF- β e citocinas que promovem o crescimento tumoral, perpetuando o ciclo. O PTHrP é marcadamente pró-osteoclasto, mas está aumentado não só no cancro da mama, que apresenta metástases predominantemente osteolíticas, mas também no cancro da próstata, mesmo quando as metástases são osteoblásticas. Assume-se que as metástases osteoblásticas nestes casos estão dependentes também de um aumento da reabsorção óssea, razão pela qual inibidores da função osteoclástica têm resultados positivos na terapêutica destas lesões [4]. A osteoclastogénese induzida pelas células tumorais envolve alterações nas proporções de RANKL e OPG, a favor da formação e ativação de osteoclastos, e está associada a um aumento da atividade osteoblástica em resposta à reabsorção, no caso das lesões metastáticas osteolíticas. De salientar que um desvio dos níveis de OPG no sentido oposto leva ao surgimento de lesões osteoblásticas [30].

A reabsorção óssea em metástases parece ser mais dependente das MMP que da catepsina K, no entanto, em ensaios clínicos, os resultados de inibidores da catepsina K

têm sido mais promissores. Tratamentos que inibem tanto os osteoclastos como o aumento associado da função osteoblástica, como os bifosfonatos, diminuem a capacidade destrutiva das metástases e diminuem a dor, mas não parecem afetar consideravelmente as células tumorais metastáticas.

Tratamentos dirigidos ao tecido ósseo em doentes com metástases ósseas têm um triplo benefício: diminuição do risco de complicações esqueléticas, diminuição da dor e inibição do ciclo vicioso da metastização óssea, sendo que, deste modo, estes fármacos podem funcionar como fármacos modificadores da doença em contexto adjuvante para vários tipos de tumores sólidos [30].

Curiosamente estudos em murinos mostraram que o eixo RANKL-RANK parece estar diretamente envolvido na patogénese de tumores mamários, pelo que em mulheres com risco elevado de desenvolverem cancro da mama, esta poderia ser uma vertente a explorar [30].

Se não tratados, a maioria dos doentes com metástases ósseas acaba por sofrer pelo menos um evento relacionado com o tecido ósseo, nomeadamente: fraturas, compressão da medula espinhal, dor óssea grave requerendo radioterapia paliativa ou analgésicos potentes, hipercalcémia da doença maligna ou instabilidade óssea necessitando de correção cirúrgica. Estes eventos reduzem a sobrevivência e a qualidade de vida e incrementam consideravelmente os custos de saúde destes doentes [31].

A terapêutica de privação androgénica no cancro da próstata, quer por castração cirúrgica, quer química, é o tratamento de primeira linha na presença de doença metastática. No entanto, este tratamento está associado a alterações metabólicas, nas quais se incluem uma diminuição da DMO, por aumento da ativação osteoclástica, mediada pela PTH, existindo um aumento da remodelação óssea e do risco de fraturas nestes doentes [32].

2.6. Tumores primários localizados ao tecido ósseo

Em cerca de 80% dos doentes com mieloma múltiplo surfem lesões osteolíticas, devido ao aumento da reabsorção óssea e à diminuição da formação óssea. Estes resultam de um aumento no recrutamento de precursores de osteoclastos e da atividade das células diferenciadas na proximidade das células do mieloma, na sequência da secreção por estas células de RANKL e interleucinas pró-inflamatórias [33].

Recentemente foi também descoberto um papel do osteoclasto no desenvolvimento do osteossarcoma. Este parece depender de um nicho de osteoclastos e macrófagos associados ao tumor nos estágios iniciais da tumorigénese para que a neoplasia se possa fixar no tecido ósseo e se desenvolver. No entanto, à medida que o osteossarcoma progride, este parece ganhar a capacidade de inibir estes mesmos osteoclastos, readquirindo um carácter migratório, que permite à doença a sua expansão. Deste modo pode-se idealizar um papel dos fármacos que atuam no osteoclasto nas fases precoces do osteossarcoma [34].

3. O Osteoclasto na condição de alvo terapêutico

Os distúrbios na formação e função do osteoclasto são diversos e estão na base do desenvolvimento de diversas patologias, tornando então esta célula e os seus mecanismos reguladores num interessante alvo terapêutico para as doenças já referidas. Visto que as doenças mais frequentes estão associadas a uma perda de massa óssea, seja por diminuição da formação de tecido ósseo, quer pelo aumento da reabsorção, os fármacos desenvolvidos têm uma ação essencialmente anti-reabsortiva, atuando nas situações em que há uma perda de massa óssea. Dentro das doenças mais frequentes do tecido ósseo a exceção é a doença de Paget, que implica um aumento da remodelação óssea em geral, mas na qual são utilizados com bons resultados tratamentos utilizados na doenças que apresentam exclusivamente perda óssea. Relativamente à osteopetrose, estão em curso estudos com suplementos enzimáticos, ainda em estádios iniciais, mas atualmente o tratamento desta patologia é essencialmente um tratamento de suporte. Também seria uma possível terapêutica de futuro a substituição enzimática com catepsina K por terapia génica na picnodisostose [5].

3.1. Bifosfonatos

Os bifosfonatos são talvez o grupo mais conhecido de fármacos que têm como alvo o osteoclasto. São atualmente fármacos de uso comum nas patologias em que existe um excesso de reabsorção óssea, incluindo: várias formas de osteoporose (juvenil, pós-menopáusia, senil, induzida por corticoides, induzida pela imobilização e induzida pela

terapêutica de privação androgénica), doença de Paget do tecido ósseo, osteogenesis imperfecta, hipercalcémia e doença metastática óssea [35].

Têm uma estrutura comum com um átomo de carbono a ligar dois grupos fosfato, mimetizando os pirofosfatos endógenos [7]. Em 1995 iniciou-se a comercialização do alendronato e rapidamente os bifosfonatos se tornaram em fármacos de eleição no tratamento da osteoporose devido à sua comodidade de administração e à sua eficácia [36], estando clinicamente provado que reduzem a probabilidade de fraturas em doentes osteoporóticos em cerca de 40-50% e que aumentam a densidade mineral óssea. Os amino-bifosfonatos, como o risedronato, o alendronato e o zoledronato, são mais potentes que os não-amino-bifosfonatos, de que são exemplo o clodronato, o tiludronato e o etidronato [7]. Ambas as classes de bifosfonatos (amino e não-amino-bifosfonatos) ligam-se à matriz óssea e são internalizados pelo osteoclasto durante a reabsorção óssea. Os bifosfonatos simples são metabolizados em análogos do ATP tóxicos, induzindo *in vitro* apoptose dos osteoclastos. Os que contêm nitrogénio exercem a sua função inibindo a via do mevalonato o que por sua vez levará à formação de um análogo do ATP que também tem a capacidade de induzir a apoptose nestas células. Apesar destes dados *in vitro*, da redução sistémica do TRAP5b e da catepsina K, ambos marcadores do número de osteoclastos, em doentes tratados com bifosfonatos, e de alguns estudos referirem uma redução dos precursores osteoclásticos após um ano de tratamento com este grupo de fármacos, biópsias da crista ilíaca de doentes sob bifosfonatos não demonstraram uma redução do número de osteoclastos. Estes resultados levantaram, no entanto, alguma discussão, visto que este tecido ósseo não está sujeito a forças de gravidade, comparativamente com os ossos longos e as vértebras, o que poderia influenciar os resultados [11]. Vários estudos comprovam uma redução da reabsorção óssea para níveis aproximados aos encontrados na pré-menopausa com o tratamento

com bifosfonatos, mas associadamente ocorre uma redução marcada da formação óssea (apesar de variável de acordo com o bifosfonatos em questão), sendo estes efeitos mantidos durante o período de tratamento. Este facto foi comprovado por medições de marcadores sistémicos e por biópsias [11]. Isto indica que os bifosfonatos respeitam o acoplamento reabsorção/formação óssea, o que vai contra o objetivo do aumento de massa óssea. No entanto, alguma atividade pró-osteoblástica dos bifosfonatos tem sido referida, assim como um efeito protetor de osteócitos e osteoblastos, mas os estudos têm apresentado posições divergentes relativamente a este campo [37].

Devido à sua elevada afinidade pela matriz óssea, os bifosfonatos podem manter-se na superfície do tecido ósseo por longos períodos de tempo, o que contribui para a sua eficácia [7]. Como reações adversas preocupantes surgem a fraturas subtrocantéricas e a osteonecrose dos maxilares [36]. A osteonecrose da mandíbula é relativamente pouco frequente nas doses comumente utilizadas na prática clínica para a osteoporose, sendo mais provável que ocorra no contexto do tratamento com bifosfonatos para a perda óssea induzida por doença maligna. Apesar da acesa discussão sobre a patogénese deste efeito secundário, esta ainda não foi totalmente estabelecida, mas parece estar associada à forte supressão da remodelação óssea, sendo a preferência pela mandíbula devido à taxa de remodelação óssea que no osso alveolar é cerca de dez vezes superior à dos ossos longos. No entanto, outros fatores estão envolvidos, nomeadamente a extração de peças dentárias e infeções [11], pelo que são necessários mais estudos para explicitar as causas deste efeito secundário.

O efeito adverso mais comum no tratamento com bifosfonatos é uma reação de fase aguda, uma síndrome que se assemelha a uma gripe associada a artralguas e mialguas com início nas 24 horas após o início do tratamento. A hipocalcémia é também comum, mas raramente sintomática, mesmo assim o suplemento com cálcio e vitamina D deve

ser administrando concomitantemente. A toxicidade renal é um dos efeitos mais preocupantes do ácido zoledrónico, devendo a dose ser ajustada às taxas de depuração da creatinina de cada doente e, por esta razão, a função renal estudada antes do início do tratamento [4, 38].

Nos homens com cancro da próstata avançado o ácido zoledrónico utilizado na dose de 4mg a cada 4 a 4 semanas reduziu significativamente a ocorrência de eventos relacionados com o tecido ósseo, o que não aconteceu com outros bifosfonatos menos potentes [32].

Resultados positivos foram também obtidos com o cancro da mama e o mieloma múltiplo, sendo defendida a continuação da terapêutica com ácido zoledrónico até ao surgimento de efeitos adversos ou diminuição da performance do fármaco [38]. No mieloma múltiplo os bifosfonatos contribuem para o controlo a longo prazo da doença óssea, reduzindo a incidência de eventos associados ao tecido ósseo, apesar de não parecer que melhorem a sobrevida dos doentes. No entanto, alguns estudos têm descrito um efeito apoptótico do ácido zoledrónico e outros bifosfonatos contendo nitrogénio nas células de mieloma múltiplo, mas não se sabe qual o significado desta ocorrência *in vivo*. Este facto associado às ações no osteoblasto dos bifosfonatos tem gerado uma corrente a favor da utilização precoce dos bifosfonatos nos doentes com mieloma múltiplo [33].

Os bifosfonatos são também utilizados na artrite reumatoide de modo a prevenir a perda óssea ocorrida quer pelo processo inflamatório, quer pela terapêutica com glucocorticoides, mas não são capazes de reverter as lesões já estabelecidas [6]. A diminuição da apoptose osteoclástica encontrada nas articulações inflamadas pode contribuir para a eficácia relativamente reduzida dos bifosfonatos em prevenir a perda óssea nesta patologia quando comparativamente com a osteoporose [14].

3.2. Estrogénios e moduladores seletivos dos recetores dos estrogénios

As terapêuticas anti-reabsortivas tiveram início com os estrogénios há cerca de 50 anos, já usados nessa altura para prevenir a perda de massa óssea. Vários estudos já comprovaram a sua eficácia, tanto na redução do número de fraturas como na capacidade de prevenir a perda óssea [36]. O seu efeito na reabsorção óssea prende-se com o facto de serem um inibidor da via do RANKL, diminuindo a diferenciação osteoclástica, existindo estudos que comprovam *in vitro* o aumento da produção de OPG por osteoblastos e os seus precursores na presença de estrogénios [7], apesar de existir alguma evidência, ainda controversa, a favor de uma ação direta nos precursores osteoclásticos [11]. No entanto, apresentam vários efeitos secundários, o que impossibilita a sua utilização no tratamento a longo prazo da osteoporose [36].

O raloxifeno é um modulador seletivo dos recetores dos estrogénios, aprovado no tratamento da osteoporose pós-menopáusia e nas fraturas vertebrais. Também este fármaco é capaz de, como os estrogénios e outros SERMs (ex.: tamoxifeno e ospemifeno), aumentar a produção de OPG. Para além desta ação, o tamoxifeno também inibe a osteoclastogénese diretamente, o que não acontece com o raloxifeno e o ospemifeno [11]. Ao contrário dos estrogénios, o raloxifeno não acarreta o aumento de risco de cancro da mama associado aos estrogénios em terapêutica de longa duração, mas, em contrapartida, os SERMs são muito menos eficazes que os estrogénios. O toremifeno provou ainda ser eficaz na redução do risco de fraturas em doentes sob terapêutica de privação androgénica, no contexto de neoplasia maligna da próstata [32]. Outros SERMs estão neste momento em desenvolvimento, que têm demonstrado uma eficácia semelhante à terapêutica de substituição hormonal com estrogénios clássica em modelos animais [7].

De salientar que, apesar do seu efeito moderado, tanto com os SERMs, como com os estrogénios, após um ano de tratamento atinge-se um plateau na DMO, que se admite ser devido à redução na formação óssea por acoplamento com a ligeira redução dos números de osteoclastos que é observada nesta terapêutica[11].

3.3. Outros fármacos que atuam no eixo RANKL/RANK/OPG

Outro fármaco que, para além dos estrogénios e SERMs, influencia o eixo RANKL/RANK/OPG através da osteoprotegerina é o fragmento cristalizável-OPG, uma proteína resultante da fusão do fragmento cristalizável (Fc) de uma imunoglobulina G (IgG1) com a OPG. Esta proteína tem uma semi-vida circulante superior à da OPG, no entanto foi abandonada, visto que se verificou ter o potencial de induzir a produção de anticorpos anti-OPG [7]. Para além disso a OPG parece ter um efeito anti-apoptótico, o que no contexto da perda de massa óssea associada a doenças malignas, poderia ser uma desvantagem [30].

Com melhores resultados temos o denosumab, um anticorpo IgG₂ humano monoclonal com elevada especificidade para o RANKL e, ao ligar-se a este, de modo semelhante à OPG [30], impede a interação com o RANK, inibindo a osteoclastogénese e a atividade reabsortiva de osteoclastos maduros. Este fármaco não só diminuiu a probabilidade de fraturas, mas também aumentou a DMO nas vértebras lombares, nos ossos da anca e no rádio distal. Os ensaios clínicos de fase III demonstram reduções na probabilidade de fraturas de 68% nas vértebras e de 40% na anca [11]. A fosfatase alcalina óssea, um indicador da atividade osteoblástica, diminuiu com esta terapêutica, mas a uma velocidade inferior à que se verifica com os bifosfonatos [7], pelo que este fármaco está de acordo com o princípio de acoplamento da remodelação óssea, como

acontece com os bifosfonatos [11]. O denosumab já foi aprovado para o tratamento da osteoporose pós-menopáusia e na perda óssea em doentes com cancro e metástases ósseas. Nesta última situação o denosumab parece ser capaz de não só inibir a reabsorção óssea, mas também de evitar o desenvolvimento de metástases ósseas [30]. O denosumab não está associado a uma resposta humoral do hospedeiro, não sendo formados anticorpos que o neutralizem ou que afetem o eixo RANK/RANKL. Os ensaios clínicos de fase III em doentes com metástases ósseas de cancro da mama, cancro da próstata e outros tumores sólidos mostraram uma superioridade do denosumab contra o ácido zoledrónico na redução da morbilidade associada a complicações ósseas [32], mas também estava associado a um aumento da DMO superior e, aparentemente, à capacidade de manter uma estrutura óssea normal [20].

Também uma forte resposta anti-tumoral foi encontrada em ensaios clínicos de fase II em doentes com tumores de células gigantes do tecido ósseo. Pelo contrário no mieloma múltiplo o denosumab não se mostrou superior ao ácido zoledrónico. Relativamente ao perfil de segurança, o denosumab pareceu ter menores percentagens de indução de efeitos tóxicos renais e de reacções de fase-aguda, mas ambos os fármacos apresentam incidências semelhantes (ou ligeiramente superiores para o denosumab) de osteonecrose da mandíbula. Anticorpos contra o denosumab surgiram apenas num pequeno número de mulheres e foram transitórios. Também não foram detetados aumentos nas taxas de infecções e reacções de toxidade, uma preocupação pertinente visto que o RANKL é um mediador do sistema linfóide, se bem que estudos de longa duração seriam importantes na avaliação destes possíveis efeitos [39]. Para doses mais altas (180 mg a cada 4 semanas, no contexto oncológico) o denosumab também desencadeou hipocalcémias, a grande maioria sem gravidade. Para chegar a um equilíbrio entre a eficácia e a segurança a dose mais habitual na perda óssea associada a

doença maligna é 120 mg a cada 4 semanas. O maior obstáculo da utilização mais generalizada do denosumab será provavelmente o seu custo inicial, apesar de um estudo em Portugal ter determinado que tem um perfil de custo-efetividade aceitável, quando comparado com as terapêuticas habitualmente utilizadas no tratamento da osteoporose pós-menopáusia [40], e o facto de a sua administração ser subcutânea [30].

Foi sugerida ainda uma vacina capaz de induzir a formação de anti-corpos contra o RANKL, testada em murinos [1], mas mais efeitos seriam necessários para avaliar a sua eficácia, durabilidade e efeitos secundários, particularmente a formação de anticorpos cruzados e influência no sistema imune.

3.4. Inibidores da Catepsina K e das Metaloproteinases da matriz

A catepsina K tem sido envolvida na patogénese de várias patologias: picnodisostose (associada à descoberta da sua importância na actividade osteoclástica), osteoporose, artrite reumatóide, osteoartrite, aterosclerose, tumores, etc. [5]. Interessantemente a catepsina K parece ter ainda o potencial de estimular os osteoblastos, por um mecanismo ainda não esclarecido, visto que em outros animais os inibidores da catepsina K estimulavam a formação de osso cortical, mas inibiam a de osso trabecular [11]. Odanacatib é um inibidor da catepsina K, atualmente em ensaios clínicos da fase III, que apesar de inibir a dissolução da matriz óssea não afeta a secreção ácida nem a viabilidade do osteoclasto. Este facto também tem como desvantagem uma reabsorção óssea não totalmente inibida e parcialmente compensada pelas metaloproteinases da matriz, o que diminui a eficácia da terapêutica. Interessantemente uma dose baixa de odanacatib parece atuar como um estimulador da remodelação óssea, contrariamente ao efeito inibidor da atividade osteoclástica

conseguida com doses maiores. Esta resposta dual não foi observada com outros fármacos antiosteoporóticos, pelo que talvez fosse interessante estudar os seus efeitos pró-remodelação. Sugiram no entanto vários efeitos adversos, nomeadamente cutâneos [36].

A inibição de MMPs, uma família de proteases dependentes do zinco que degradam as proteínas da matriz extracelular, também tem sido uma das estratégias estudadas. Especificamente a MMP-9 tem sido envolvida nos processos de reabsorção óssea, pelo que se torna num alvo terapêutico de interesse. Fármacos especificamente dirigidos às MMPs ainda estão em fases precoces de desenvolvimento, mas atuações indiretas, por inibição de cinases, como a JAK e a p38, envolvidas na transdução de sinais que leva à expressão de enzimas osteoclásticas funcionais, da qual fazem parte as MMPs [7].

3.5. *Calcitonina*

A calcitonina foi aprovada para o tratamento da osteoporose na década de 80, no entanto, e apesar de os osteoclastos apresentarem um recetor para a calcitonina, os efeitos desta na osteoclastogénese eram menos marcados que os dos estrogénios [36], com uma redução de fraturas em doentes osteoporóticas de cerca de 40% [7]. É uma hormona polipeptídica com 32 aminoácidos e produzida por humanos e vários animais. Atua por interação com um recetor específico para a calcitonina nos osteoclastos, levando a alterações no citoesqueleto dos osteoclastos e, por conseguinte, inibindo a reabsorção óssea [41], mas, ao contrário dos bifosfonatos, por exemplo, não promove a apoptose dos osteoclastos, tendo até algum efeito protetor [7]. Apesar do efeito relativamente pequeno na DMO, a calcitonina parece proteger a estrutura trabecular do

tecido ósseo, o que contribuirá para os resultados positivos desta terapêutica [41]. Curiosamente, a calcitonina tem maior efeito em osteoclastos mais ativos, pelo que, de modo a otimizar a terapêutica, a calcitonina deverá ser administrada à noite, quando se observa o pico da função osteoclástica. Esta particularidade da calcitonina de preferência por osteoclastos mais ativos é útil, por exemplo, na doença de Paget [41]. Tem como vantagem o reduzido espectro de reações secundárias, com uma margem terapêutica considerável, visto que para doses cerca de 100 vezes superiores à dose recomendada surgem efeitos que não põem em risco a vida do doente e que são transitórios [41], com exceção de irritação da mucosa nasal com a administração intranasal e efeitos gastro-intestinais com a formulação oral em doses superiores à de 0,8mg/dia que tem sido utilizada nos ensaios clínicos, e o efeito analgésico que apresenta quando utilizada em doentes com fraturas vertebrais por compressão, com osteoporose, com doença de Paget ou com outras doenças malignas [41], mas, atualmente, a administração parenteral, intramuscular ou intranasal, reduz a adesão dos doentes à terapêutica. Estão em curso investigações para uma formulação oral da calcitonina, que poderiam tornar a sua utilização mais atrativa. Esta formulação oral da calcitonina associa a calcitonina à molécula 5-CNAC (do inglês 8-(N-2-hydroxy-5-chloro-benzoyl)-amino-caprylic acid), que, ao interagir com a calcitonina, gera uma substância insolúvel em pH ácido, reduzindo a degradação da molécula por peptidases [41], já em ensaios clínicos de fase II, foi otimizada farmacocinética e farmacodinamicamente [11]. Outra desvantagem prende-se com o fato de o uso prolongado poder resultar na internalização de recetores e uma consequente redução na eficácia [7], apesar de existirem dados contraditórios, visto que um estudo com calcitonina oral indicou que a internalização que ocorria não era suficiente para afectar significativamente a eficácia do fármaco [41]. A dose eficaz de calcitonina associada a

uma redução da probabilidade de fraturas ficou estabelecida nas 200 IU de calcitonina diárias, por um período de até 5 anos [41].

3.6. Ranelato de estrôncio

O ranelato de estrôncio foi aprovado em 2004 na Europa, mostrando uma redução de cerca de 34% na probabilidade de fraturas vertebrais. Este fármaco tem uma dupla ação: promove a formação de tecido ósseo, através da estimulação da diferenciação osteoblástica, e diminui a reabsorção óssea, através do eixo RANK/RANKL/OPG, via aumento da produção de OPG[11]. Em ensaios clínicos até 5 anos não mostrou efeitos secundários graves, pelo que a terapêutica a longo prazo com este fármaco seria interessante, visto que o seu mecanismo dual permite uma aproximação ao processo fisiológico da remodelação[7]. Deste modo o ranelato de estrôncio promove um desacoplamento da remodelação óssea, com um aumento da formação de tecido ósseo.

3.7. Inibidores da secreção ácida

A ATPase vacuolar (V-ATPase) e o canal de cloro 7 (CIC-7) são relativamente específicos do osteoclasto e inibidores destes transportadores de iões têm demonstrado uma diminuição da reabsorção osteoclástica associada a um aumento da sobrevivência osteoclástica devido a esta quiescência funcional, pelo que se têm tornado num interessante alvo de estudo, devido ao seu potencial de desacoplamento da remodelação óssea. Inibidores do CIC-7 em ratos ovariectomizados com idade avançada relevaram uma prevenção da reabsorção óssea de cerca de 50%, associado a um aumento do número de osteoclastos e sem alterações nos níveis dos marcadores de formação óssea.

Resultados semelhantes foram encontrados para os inibidores da V-ATPase. Um estudo utilizando próteses revestidas com bafilomicina mostrou uma elevação do número de osteoclastos associados a um aumento da formação óssea [11].

Um estudo estabeleceu que a utilização de inibidores do processo de acidificação nas lacunas de reabsorção, nomeadamente a bafilomicina A1 e a difilina, ambos inibidores da V-ATPase, e a etoxizolamida, um inibidor da CA2, impedia por completo o processo de reabsorção, ao contrário do que acontece com os inibidores da proteólise [42].

Apesar de uma variedade considerável de inibidores da secreção ácida ainda não existem certezas sobre a aplicabilidade destes fármacos na prática clínica, nomeadamente relativas a segurança e eficácia, sendo eventualmente necessário o desenvolvimento de compostos mais específicos de modo a diminuir possíveis efeitos secundários [43].

3.8. Peptídeo similar ao glucagon-2

O GLP-2 é um peptídeo com 33 aminoácidos, gerado por clivagem pós-tradução proteica do proglucagon, num processo que também origina o peptídeo similar ao glucagon-1 (GLP-1), pelas células L do epitélio intestinal e por várias células neuronais no sistema nervoso central. O GLP-2 intestinal é secretado após a ingestão alimentar, o que se relaciona com a redução pós-prandial da reabsorção óssea. Para além disso o GLP-2 parece não afetar a formação de tecido ósseo [11].

3.9. Outros fármacos

A integrina $\alpha v \beta_3$ está envolvida em processos de adesão celular, nomeadamente ao tecido ósseo, particularmente na reabsorção óssea, mas também na adesão de metástases, pelo que foi desenvolvido um inibidor desta integrina para tentar travar a fixação de metástases ósseas. Os dados pré-clínicos mostraram uma redução da destruição óssea [4].

Também anticorpos contra a PTHrP ou inibidores da ação deste péptido bloqueiam a reabsorção óssea em modelos experimentais [4]. Curiosamente apesar de a PTHrP favorecer a reabsorção óssea, a sua administração intermitente parece ter o efeito oposto[44].

O rituximab é um anticorpo anti-CD20 que diminui as células B e que se mostrou eficaz em pacientes com artrite reumatóide com factor reumatóide positivo. O tratamento com rituximab diminui a progressão da destruição das articulações e do osso subcondral, que é mediado pelo osteoclasto. Estudos comprovaram um efeito considerável do Rituximab no eixo RANK/RANKL/OPG, com estabilização das lesões na maioria dos doentes avaliados. Estes dados são a favor da influência do sistema imune na remodelação óssea, nomeadamente um papel importante das células B [29].

O dasatinib é um inibidor de tirosina cinases, com um espectro de ação mais amplo e mais potente que o imatinib, tendo sido desenvolvido para tratamento de leucemias resistentes a este último fármaco. Este fármaco tem a particularidade de inibir as cinases da família Src, envolvidas na regulação do osteoclasto. De momento estão a decorrer ensaios de fase II para diversos tipos de tumores (próstata, mama, cólon e pulmão). Um estudo demonstrou que doses baixas de dasatinib atuavam como um agente modificador do tecido ósseo, com um efeito tanto anabólico como anti-reabsortivo ósseo, pelo que seria interessante continuar a investigação de modo a perceber se seria aplicável a

utilização deste fármaco para doenças do tecido ósseo, mesmo fora do contexto oncológico [45]. Também outros inibidores com ação nas cinases Src também estão a ser estudados como o saracatinib e o bosutinib [7].

Também análogos do resveratrol, um composto de origem vegetal com propriedades inibitórias da reabsorção e pró-osteoblásticas, têm um efeito *in vitro* mais potente, mas na mesma linha da molécula original, pelo que estudos que pudessem demonstrar a sua eficácia e segurança *in vivo* seriam interessantes. Estes análogos não apresentaram o efeito inibidor da proliferação de células de mieloma múltiplo, que ocorreu para doses altas de resveratrol [46].

A alfaradina (Ra-223 Cl₂) é um agente específico para o tecido ósseo com a capacidade de emitir partículas alfa, que tem mostrado resultados promissores em estudos de fase II no tratamento de metástases ósseas [47].

Finalmente uma menção terapêutica génica, ainda em fases muito precoces, mas a silenciamento de genes poderá vir a ser uma realidade no futuro e o osteoclasto apresenta vários alvos passíveis de atuação deste género de terapêuticas [48].

3.10. Agentes anabólicos

Uma referência aos agentes que favorecem a formação de tecido ósseo, como é o caso da teriparatida, um análogo da hormona da paratiroide (PTH 1-34) com eficácia na prevenção de fraturas vertebrais e não vertebrais de 35 a 65% em doentes osteoporóticos, que atua por aumento da proliferação de precursores de osteoblastos e da atividade osteoblástica. A associação da teriparatida a um agente anti-reabsortivo não traz vantagens em termos da prevenção de fraturas[7]. A teriparatida, apesar de relativamente pouco estudada a sua relação com o osteoclasto, parece estimular a

osteoclastogénese por uma indução temporária na expressão de RANKL e aparentemente é necessária a presença de osteoclastos maduros, para que este fármaco possa exercer o seu efeito estimulante na formação de tecido ósseo [11].

Outra área de estudo inclui os calcilíticos: antagonistas dos recetores orais do cálcio, que parecem estimular a secreção de PTH, de modo transitório e a formação de tecido ósseo, mas apesar dos estudos animais apresentarem bons resultados, os ensaios clínicos em mulheres pós-menopáusicas foram suspensos devido à sua estreita janela terapêutica [44].

A nitroglicerina mostrou um efeito positivo na produção óssea, mas os efeitos secundários que surgiram nos ensaios clínicos levaram a frequentes desistências da terapêutica, pelo que uma forma mais segura para tratamento de longa duração seria interessante [44].

A esclerostina é uma proteína, produzida pelos osteócitos, que afeta negativamente a proliferação, diferenciação e atividade de mineralização da matriz dos osteoblastos. Esta molécula liga-se a BMPs e a recetores celulares de modo a antagonizar a ação das BMP e da cascata de sinalização Wnt [6]. Anticorpos contra esta molécula têm sido criados, na tentativa de ao frear a sua atividade, fomentar a produção de tecido ósseo [7].

Também a DKK1 é um antagonista da via Wnt, pelo que também tem sido explorada esta alternativa para a promoção da osteoblastogénese [4].

4. Conclusões

O osteoclasto oferece uma variedade de alvos terapêuticos, com interesse em múltiplas patologias. A investigação em novas terapêuticas e os resultados dos ensaios clínicos em curso poderão trazer numerosas avanços, tanto por diminuição dos efeitos adversos (como é o caso da osteonecrose da mandíbula com os bifosfonatos), quanto por facilidade da administração (de que é exemplo a calcitonina oral), e ainda, por permitir uma melhor qualidade do tecido ósseo e prolongar os efeitos terapêuticos no tempo, com o aumento da qualidade de vida e, em alguns casos, da sobrevida dos doentes que sofrem de doenças do tecido ósseo.

Alguns fármacos têm vindo a ser destacados, nomeadamente o denosumab e a calcitonina, pelos bons resultados que apresentaram em ensaios clínicos e também pela diminuição efeitos secundários e, no caso da calcitonina pelo interesse que o desacoplamento reabsorção/formação de tecido ósseo tem na formação de um tecido ósseo com uma estrutura de qualidade. Salientam-se ainda os inibidores do processo de acidificação: estes apresentam não só o potencial de inibir a reabsorção óssea significativamente, mas também, ao não levarem à apoptose dos osteoclastos, de manterem os níveis de formação óssea.

Previsivelmente nos próximos anos este será um tópico de acesa investigação e, devido ao conhecimento cada vez mais aprofundado da histologia e biologia molecular do osteoclasto e dos processos associados à remodelação óssea. Novas terapêuticas dirigidas ao tecido ósseo e, particularmente, ao osteoclasto estão em desenvolvimento, em estudos pré-clínicos ou já em ensaios clínicos, sendo de prever avanços significativos nesta área de investigação científica.

5. Bibliografia

1. Narducci, P., R. Bareggi, and V. Nicolin, *Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology*. Acta Histochem, 2011. **113**(2): p. 73-81.
2. Direcção-Geral da Saúde, *Orientação Técnica para a utilização da absorciometria radiológica de dupla energia (DEXA)*. 2008 27-03-2013]; Available from: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i009644.pdf>.
3. Reid, I.R., *Pharmacotherapy of Paget's disease of bone*. Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(5): p. 637-46.
4. Theriault, R.L. and R.L. Theriault, *Biology of bone metastases*. Cancer Control, 2012. **19**(2): p. 92-101.
5. Zhao, Q., Y. Jia, and Y. Xiao, *Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(4): p. 721-3.
6. Choi, Y., J.R. Arron, and M.J. Townsend, *Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(10): p. 543-8.
7. Sun, S., *Bone disease drug discovery: examining the interactions between osteoblast and osteoclast*. Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(2): p. 239-51.
8. Lieben, L. and G. Carmeliet, *The Involvement of TRP Channels in Bone Homeostasis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 99.
9. Hwang, S.Y. and J.W. Putney, Jr., *Calcium signaling in osteoclasts*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 979-83.
10. Troen, B.R., *Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation*. Exp Gerontol, 2003. **38**(6): p. 605-14.

11. Henriksen, K., et al., *Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis*. Endocr Rev, 2011. **32**(1): p. 31-63.
12. Vaananen, K., *Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(7): p. 959-71.
13. Edwards, J.R. and M.M. Weivoda, *Osteoclasts: malefactors of disease and targets for treatment*. Discov Med, 2012. **13**(70): p. 201-10.
14. Xing, L. and B.F. Boyce, *Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(3): p. 709-20.
15. Hsu, Y.H., et al., *Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibits the differentiation of osteoclasts and protects against osteoporotic bone loss*. J Exp Med, 2011. **208**(9): p. 1849-61.
16. Ignatius, A., et al., *Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1beta*. J Cell Biochem, 2011. **112**(9): p. 2594-605.
17. Kwan Tat, S., et al., *IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 49-60.
18. Quinn, J.M. and H. Saleh, *Modulation of osteoclast function in bone by the immune system*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **310**(1-2): p. 40-51.
19. Eriksen, E.F., *Cellular mechanisms of bone remodeling*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(4): p. 219-27.
20. Dempster, D.W., et al., *Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data*. Clin Ther, 2012. **34**(3): p. 521-36.

21. Cheung, W.Y., C.A. Simmons, and L. You, *Osteocyte apoptosis regulates osteoclast precursor adhesion via osteocytic IL-6 secretion and endothelial ICAM-1 expression*. Bone, 2012. **50**(1): p. 104-10.
22. Brakspear, K.S. and D.J. Mason, *Glutamate signaling in bone*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 97.
23. Dong, X.N., et al., *In situ accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs) in bone matrix and its correlation with osteoclastic bone resorption*. Bone, 2011. **49**(2): p. 174-83.
24. WHO SCIENTIFIC GROUP ON THE ASSESSMENT OF OSTEOPOROSIS AT PRIMARY HEALTH CARE LEVEL. 2007, World Health Organization.
25. Imai, Y., et al., *Minireview: osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor-alpha*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(5): p. 877-85.
26. Weinstein, R.S. and S.C. Manolagas, *Apoptosis and osteoporosis*. Am J Med, 2000. **108**(2): p. 153-64.
27. Westenfeld, R., et al., *Impact of sirolimus, tacrolimus and mycophenolate mofetil on osteoclastogenesis--implications for post-transplantation bone disease*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(12): p. 4115-23.
28. Stark, Z. and R. Savarirayan, *Osteopetrosis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 5.
29. Boumans, M.J., et al., *Rituximab abrogates joint destruction in rheumatoid arthritis by inhibiting osteoclastogenesis*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(1): p. 108-13.
30. Brown, J.E. and R.E. Coleman, *Denosumab in patients with cancer-a surgical strike against the osteoclast*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(2): p. 110-8.
31. Kinnane, N., *Burden of bone disease*. Eur J Oncol Nurs, 2007. **11 Suppl 2**: p. S28-31.

32. Lee, R.J., P.J. Saylor, and M.R. Smith, *Contemporary therapeutic approaches targeting bone complications in prostate cancer*. Clin Genitourin Cancer, 2010. **8**(1): p. 29-36.
33. Barille-Nion, S., et al., *Advances in biology and therapy of multiple myeloma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 248-78.
34. Endo-Munoz, L., A. Evdokiou, and N.A. Saunders, *The role of osteoclasts and tumour-associated macrophages in osteosarcoma metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1826**(2): p. 434-42.
35. Drake, M.T., B.L. Clarke, and S. Khosla, *Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(9): p. 1032-45.
36. Rosen, C.J., *Exploiting new targets for old bones*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(5): p. 934-6.
37. Maruotti, N., et al., *Bisphosphonates: effects on osteoblast*. Eur J Clin Pharmacol, 2012. **68**(7): p. 1013-8.
38. Smith, M.R., *Osteoclast targeted therapy for prostate cancer: bisphosphonates and beyond*. Urol Oncol, 2008. **26**(4): p. 420-5.
39. Gallagher, J.C., *Advances in bone biology and new treatments for bone loss*. Maturitas, 2008. **60**(1): p. 65-9.
40. Cristino J, C.H., Perelman J, Santos C, Machado M , Pereira J, *Análise de custo-utilidade do denosumab em comparação com a prática clínica corrente no tratamento da osteoporose pós-menopáusia* in *Conferência Nacional de Economia da Saúde*. 2011, Associação Portuguesa de Economia da Saúde: Lisboa.

41. Karsdal, M.A., et al., *Calcitonin: a drug of the past or for the future? Physiologic inhibition of bone resorption while sustaining osteoclast numbers improves bone quality*. BioDrugs, 2008. **22**(3): p. 137-44.
42. Neutzsky-Wulff, A.V., et al., *Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption--implications for osteoclast quality*. BMC Musculoskelet Disord, 2010. **11**: p. 109.
43. Qin, A., et al., *V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(9): p. 1422-35.
44. Lippuner, K., *The future of osteoporosis treatment - a research update*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13624.
45. Garcia-Gomez, A., et al., *Dasatinib as a bone-modifying agent: anabolic and anti-resorptive effects*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34914.
46. Kupisiewicz, K., et al., *Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts*. Calcif Tissue Int, 2010. **87**(5): p. 437-49.
47. Harrison, M.R., et al., *Radium-223 chloride: a potential new treatment for castration-resistant prostate cancer patients with metastatic bone disease*. Cancer Manag Res, 2013. **5**: p. 1-14.
48. Wang, Y. and D.W. Grainger, *RNA therapeutics targeting osteoclast-mediated excessive bone resorption*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(12): p. 1341-57.

Bibliografia

1. Junqueira, L.C.U. and J. Carneiro, *Histologia básica: texto, atlas*. 2008: Guanabara-Koogan.

2. Judas, F., Palma, P, Falacho, RI, Figueiredo, H *Estrutura e dinâmica do tecido ósseo*. 2012.